

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580117

研究課題名(和文)ピルビン酸低減清酒酵母のピルビン酸低減メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of pyruvate-underproducing sake yeast.

研究代表者

北垣 浩志 (Kitagaki, Hiroshi)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70372208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：清酒醸造時にアルコール濃度は18 - 20%に達する。瓶詰時には15 - 16%になるものの醸造酒としては世界で最もアルコール濃度が高い。従って清酒を健康な酒にするためには低アルコール濃度で高品質の酒を造るための技術が必要である。しかし低アルコール濃度で清酒を造るとジアセチルなどの好まれない香りが発生する。そこで本研究ではジアセチルの前駆体であるピルビン酸生成が少ない清酒酵母を育種し、その原因がミトコンドリアの活性化であることを明らかにした。育種した酵母は日本醸造協会を通じてスパークリング清酒の製造などに広く活用されている。ミトコンドリアに着目することは醸造酵母育種の新たなスキームとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The concentration of ethanol of sake reaches 18-20% during sake brewing. Although the concentration of ethanol of sake is decreased to 15-16% after bottling, anyway the concentration of ethanol is one of the highest in the brewed alcoholic beverages in the world. Therefore, to make sake a healthy alcoholic beverage, brewing technologies to decrease the concentration of ethanol is desired. However, off-flavor, diacetyl is generated during manufacturing of low alcohol sake. To circumvent this problem, we developed a pyruvate-underproducing sake yeast, which is now delivered from The Brewing Society of Japan and widely utilized. We elucidated that mitochondrial metabolism is activated in the pyruvate-underproducing sake yeast. Focusing on mitochondria has now emerged as a novel target of breeding of brewery yeasts.

研究分野：発酵微生物学

キーワード：清酒 酵母 ミトコンドリア ピルビン酸 低アルコール清酒 スパークリング清酒

1. 研究開始当初の背景

清酒醸造において、酵母が生産するエタノール濃度は18 - 20%にも達する。この後瓶詰時にアルコール濃度15 - 16%にまで希釈するものの、世界で最もアルコール濃度の高い醸造酒の部類に入る。一方、低アルコール濃度で清酒を造ろうとすると、好まれない香りであるジアセチルが発生してしまうという問題があった。そこで我々はジアセチルの前駆体であるピルビン酸の少ない清酒酵母を、ミトコンドリア輸送阻害剤への耐性という指標で育種した。この清酒酵母は現在、日本醸造協会を通じて全国へ頒布され活用されている。

2. 研究の目的

上記のピルビン酸低減清酒酵母は、ミトコンドリアへのピルビン酸の輸送が活性化しているという仮説で育種を行った。しかし、本当にミトコンドリアへのピルビン酸の輸送が増強しているのか、ミトコンドリアにおけるピルビン酸代謝が活性化しているのかはわかっていなかった。この酵母のピルビン酸低減メカニズムがわかれば、他の醸造酵母のピルビン酸低減のための技術開発のヒントになると考え、そのメカニズムを解析することにした。

3. 研究の方法

安定同位体炭素 ^{13}C を含む培地でピルビン酸低減清酒酵母を培養し、メタボローム解析を行った。ピルビン酸低減清酒酵母から、ミトコンドリアを単離してその酸素消費速度を測定した。ピルビン酸低減清酒酵母からゲノムを抽出し、Illumina MiSeq を用いてゲノム解析を行った。

4. 研究成果

代謝フラックス解析の結果、ピルビン酸低減酵母は、その親株に比べてミトコンドリア代謝が増加していることが明らかになった。ピルビン酸低減清酒酵母のピルビン酸を基質としたミトコンドリア呼吸活性は親株よりも高いことが明らかになった。ミトコンドリア輸送に関わる遺伝子の発現は、ピルビン酸低減酵母では増加していなかった。これらの結果は、ピルビン酸低減酵母はミトコンドリア代謝活性が増加しているためにピルビン酸が低減していること、および、ミトコンドリア活性が酵母育種の新たなターゲットになることを示している。ピルビン酸低減清酒酵母のゲノム解析も行い、ピルビン酸低減の責任遺伝子の候補をいくつか取得することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計14件)

1. Kazutaka Sawada, Tomoya Sato, Hiroshi Hamajima, Lahiru Niroshan Jayakody, Miyo Hirata, Mikako Yamashiro, Marie Tajima, Susumu Mitsutake, Koji Nagao, Keisuke Tsuge, Fumiyoshi Abe, Kentaro Hanada, and Hiroshi Kitagaki*

Glucosylceramide contained in mold-cultured cereal confers membrane and flavor modification and stress tolerance to yeast during co-culture fermentation

Applied and Environmental Microbiology, in press (2015) (査読有)

2. Lahiru N. Jayakody, Masafumi Kadowaki, Keisuke Tsuge, Kenta Horie, Akihiro Suzuki, Nobuyuki Hayashi, and Hiroshi Kitagaki*

SUMO expression shortens the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth caused by complex interactive effects of major mixed fermentation inhibitors found in hot-compressed water-treated lignocellulosic hydrolysate.

Appl. Microbiol. Biotechnol., 99, 1, 501-515 (2015) (査読有)

3. Biomass utilization technologies to cope with future energy demand in Asia

Lahiru Niroshan Jayakody, Kenta Horie, Nobuyuki Hayashi and Hiroshi Kitagaki*
Best papers of The 1st Asia Future Conference, p27-38 (2014). (査読無)

4. 中畑絵理子、北垣浩志

伝統的発酵における麹菌スフィンゴ脂質の酵母への移行とその生理的意義

日本農芸化学会誌 化学と生物, 53, 1, 7-8 (2015) (査読有)

5. Takahiro Oba, Kenichi Kusumoto, Yuki Kichise, Eiji Izumoto, Shunichi Nakayama, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara & Hiroshi Kitagaki

Variations in mitochondrial membrane potential correlate with malic acid production by natural isolates of *Saccharomyces cerevisiae* sake strains

FEMS Yeast Research, 14(5):789-96 (2014) (査読有)

6. エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS/MS) による芋焼酎粕に含まれるグルコシルセラミドの構造決定

澤田和敬、中畑絵里子、柘植圭介、平田みよ、高峯和則、永尾晃治、北垣浩志*
日本醸造学会誌, 109, 7, 535-542 (2014) (査読有)

7. 北垣浩志

清酒酵母のミトコンドリア活性・分解に制御される新たな代謝経路の解明とそれに基づいた醸造技術の開発

日本醸造協会誌, 109, 3, 1-11 (2014) (査読有)

8. 北垣浩志、尾上貴俊、長崎歩、北村整一
焼酎粕・酒粕・麹菌から見出したグルコシルセラミドの構造および機能性

Fragrance Journal, 41, 12, 21-27 (2013) (査読有)

9. Shodai Shiroma, Lahiru Niroshan Jayakody, Kenta Horie, Koji Okamoto and Hiroshi Kitagaki*

Enhancement of ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strain by disrupting mitophagy function.

Applied and Environmental Microbiology, 80 (3), 1002-1012 (2014). (査読有)

10. Kazuki Izumi and Hiroshi Kitagaki*
Sphingolipids in the unutilized biomass resources of alcohol fermentation industries in Japan.

Current Research in Agricultural and Food Chemistry, 3, 1-41, (2014) (査読有)

11. Gennaro Agrimi, Maria C. Mena, Kazuki Izumi, Isabella Pisano, Lucrezia Germinario, Hisashi Fukuzaki, Luigi Palmieri, Lars M. Blank and Hiroshi Kitagaki

Improved sake metabolic profile during fermentation due to increased mitochondrial pyruvate dissimilation.

FEMS Yeast Research, 14(2):249-260 (2014) (査読有)

12. Hiroshi Kitagaki* and Hiroshi Takagi
Mitochondrial metabolism and stress response of yeast: Applications in fermentation technologies.

Journal of Bioscience and Bioengineering, 117(4):383-393 (2014). (査読有)

13. Hiroshi Kitagaki*, Haidong Tan and Lahiru Niroshan Jayakody.

Analysis of the role of mitochondria of sake yeast during sake brewing and its applications in fermentation technologies.

AGri-Bioscience Monographs, vol. 3, p1-12 (2013) (査読有)

14. Koshiro Takahashi, Kazuki Izumi, Eriko Nakahata, Miyo Hirata, Kazutaka Sawada, Keisuke Tsuge, Koji Nagao and Hiroshi Kitagaki*

Quantitation and structural determination of glucosylceramides contained in sake lees.

Journal of Oleo Science, 63, 1, 15-23 (2014) (査読有)

[学会発表](計9件)

1. 門脇真史、北垣浩志

メタボローム空間上の座標を志向した未知醸造酵母のスクリーニング、2014年09月酵母遺伝学フォーラム、東京都

2. 佐藤友哉、北垣浩志、麹菌 Glucosylceramideによる酵母の生理機能賦与、2014年9月、酵母遺伝学フォーラム、東京都

3. 泉知輝、北垣浩志、嫌気環境移行時の醸造酵母の残存ミトコンドリア活性と脂肪酸不飽和化活性の競争的相互作用、2014年10月、日本生物工学会大会、札幌市

4. 中畑絵里子、北垣浩志、麹に含まれる5-アミノレブリン酸に着目した黒酢の高機能化の試み、2014年10月、日本生物工学会大会、札幌市

5. 福崎久詩、北垣浩志、ピルビン酸低減清酒酵母のピルビン酸低減メカニズム解析、2014年10月、日本生物工学会、札幌市

6. 北垣浩志、麹セラミドの皮膚・免疫・発酵への作用、2015年3月、日本農芸化学会、岡山県

7. 北垣浩志、酒類醸造における酵母ミトコンドリアの新しい役割とそれを基盤にした技術開発、2014年10月、日本生物工学会、札幌市

8. 澤田和敬、柘植圭介、吉村臣史、鶴田裕美、稲橋正明、田口誠我、福崎久詩、北垣浩志、ピルビン酸低減清酒酵母の実地醸造試験、2015年3月、日本農芸化学会、岡山県

9. ジャヤコディー ラヒル、門脇真史、柘植圭介、堀江健太、鈴木章弘、林信行、北垣浩志、SUMOの発現は複数の発酵阻害物による酵母の増殖遅延を改善する、2015年3月、日本農芸化学会、岡山県

[図書](計7件)

1. 北垣浩志

清酒酵母のミトコンドリアの解析と酵母育種・有機酸制御への応用
清酒酵母 2000 年代の研究, in press (2013)

2. Lahiru N. Jayakody , Nobuyuki Hayashi and Hiroshi Kitagaki*

The breeding of bioethanol-producing yeast by detoxification of glycolaldehyde, a novel fermentation inhibitor

Springer, Stress Biology of Yeasts and Fungi: Application for Industrial Brewing and Fermentation, 3-21 (2015).

3. 佐藤友哉、澤田和敬、浜島弘史、北垣浩志
アルコール発酵時の清酒酵母におけるミトコンドリアを介した代謝

CMC 出版 発酵・醸造食品の最前線, 109-116 (2015)

4. 松永陽香、浜島弘史、北垣浩志
麹菌の生産するスフィンゴ脂質の酵母の膜・発酵特性に対する影響

CMC 出版 発酵・醸造食品の最前線, 56-63 (2015)

5. 北垣浩志

「ミトコンドリアの機能」、原島俊、高木博史編「酵母 応用から基礎へ」化学同人 (p135-150, 2013)

6. Lahiru N. Jayakody , Nobuyuki Hayashi and Hiroshi Kitagaki*

Molecular mechanisms for detoxification of major aldehyde inhibitors for production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* from hot-compressed water-treated lignocellulose.

Materials and Processes for Energy: communicating current research and technological developments, A. Mendez-Vilas (Ed.), p302-311 (2013)

7. Lahiru N. Jayakody, Nobuyuki Hayashi and Hiroshi Kitagaki*

Identification of a novel fermentation inhibitor of bioethanol production, glycolaldehyde, and engineering of a yeast strain tolerant to hot-compressed water-treated cellulose.

Biotechnology and Bioinformatics; Advances and Applications for Bioenergy, Bioremediation and Biopharmaceutical Research, Chapter 9, p231-248, ISBN: 9781771880015 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：発酵助成剤および微生物の発酵助成方法

発明者：北垣浩志

権利者：佐賀大学

種類：特許出願

番号：特開 2015-061521

出願年月日：2014 年 08 月 12 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：ピルビン酸低生産酵母の育種方法

発明者：北垣浩志

権利者：佐賀大学

種類：特許登録

番号：特許 2010-111263

出願年月日：2009 年 5 月 26 日

取得年月日：2014 年 11 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://seisansystem.ag.saga-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北垣浩志 (KITAGAKI, Hiroshi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：70372208

(3) 連携研究者

赤尾健 (AKAO, Ken)

独立行政法人酒類総合研究所・情報技術支援部門・副部門長

研究者番号：50416426